

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

18. 6. 2004

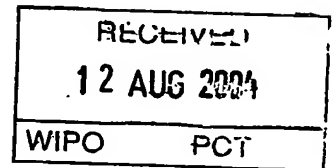
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 3 年 1 0 月 2 1 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 3 6 0 9 8 6
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 6 0 9 8 6]

出 願 人
Applicant(s): 積水化学工業株式会社

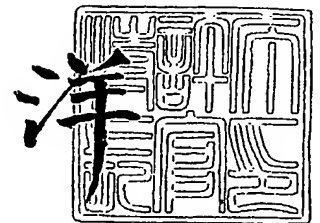


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 7 月 3 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 03P01655
【提出日】 平成15年10月21日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C01G 49/00
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山 2 - 1 積水化学工業株式会社内
 【氏名】 岡 孝之
【発明者】
 【住所又は居所】 横浜市旭区中沢 3 丁目 2 2 番 8 号
 【氏名】 川口 春馬
【発明者】
 【住所又は居所】 さいたま市東大成町 2 丁目 6 0 0 番 7 号
 【氏名】 涌井 渉
【特許出願人】
 【識別番号】 000002174
 【氏名又は名称】 積水化学工業株式会社
 【代表者】 大久保 尚武
【先の出願に基づく優先権主張】
 【出願番号】 特願2002-305969
 【出願日】 平成14年10月21日
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 005083
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

有機高分子物質と平均粒径 1 ～ 30 nm の磁性体とからなる磁性体内包粒子であって、その内部に前記磁性体を分散状態で含有することを特徴とする磁性体内包粒子。

【請求項 2】

磁性体は、粒子を形成させる重合過程において粒子内部で金属イオンが酸化して形成されたものであることを特徴とする、請求項 1 記載の磁性体内包粒子。

【請求項 3】

金属イオンは、鉄イオンであることを特徴とする、請求項 2 記載の磁性体内包粒子。

【請求項 4】

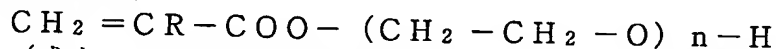
有機高分子物質は、アクリル系モノマーからなる重合体を主構成成分とすることを特徴とする、請求項 1、2 又は 3 記載の磁性体内包粒子。

【請求項 5】

アクリル系モノマーは、グリシジル基を有するモノマーであることを特徴とする、請求項 4 記載の磁性体内包粒子。

【請求項 6】

アクリル系モノマーは、グリシジル基を有するモノマー及び下記一般式で表されるポリエチレングリコール（メタ）アクリレートであることを特徴とする、請求項 4 記載の磁性体内包粒子。



（式中、R は H 又は CH_3 を表し、n は 2 ～ 20 の整数を表す。）

【請求項 7】

平均粒径が 0.05 ～ 1 μm であることを特徴とする、請求項 1、2、3、4、5 又は 6 記載の磁性体内包粒子。

【請求項 8】

磁性体の含有量が 0.1 ～ 40 重量%であることを特徴とする、請求項 1、2、3、4、5、6 又は 7 記載の磁性体内包粒子。

【請求項 9】

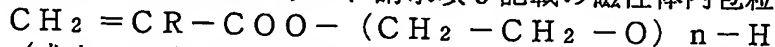
水系溶媒中において疎水性モノマー及び／又は親水性モノマーを重合して粒子を形成する工程と、
前記粒子中に金属イオンを取り込みながら前記金属イオンを酸化して磁性体を形成する工程とからなり、
前記粒子を形成する工程と前記磁性体を形成する工程とを同時に進行させることを特徴とする磁性体内包粒子の製造方法。

【請求項 10】

疎水性モノマーは、グリシジル基を含有するアクリル系モノマーであることを特徴とする、請求項 9 記載の磁性体内包粒子の製造方法。

【請求項 11】

親水性モノマーは、下記一般式で表されるポリエチレングリコール（メタ）アクリレートであることを特徴とする、請求項 9 記載の磁性体内包粒子の製造方法。



（式中、R は H 又は CH_3 を表し、n は 2 ～ 20 の整数を表す。）

【請求項 12】


粒子を形成する工程において、共重合モノマーとして反応性乳化剤を添加することを特徴とする、請求項 9、10 又は 11 記載の磁性体内包粒子の製造方法。

【請求項 13】

粒子を形成する工程において、重合開始剤を後添加することを特徴とする、請求項 9、10、11 又は 12 記載の磁性体内包粒子の製造方法。

【請求項 14】

有機高分子物質と平均粒径 1 ～ 30 nm の磁性体とからなり、その内部に前記磁性体を



分散状態で含有する磁性体内包粒子に、抗原又は抗体が吸着又は結合していることを特徴とする免疫測定用粒子。

【書類名】明細書

【発明の名称】磁性体内包粒子とその製造方法、及び磁性体内包粒子を用いた免疫測定用粒子

【技術分野】

【0001】

本発明は、均一な磁性を有するとともに、粒径分布が狭く、かつ分散安定性に優れており、免疫測定用粒子として有用な磁性体を内包する高分子粒子とその製造方法、及びそれを用いた免疫測定用粒子に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、磁性体内包粒子の作製法としては、(1) 作製済みの高分子粒子に鉄イオンを含ませて磁性体内包粒子を作製する方法、(2) モノマーから粒子を重合する過程で作製済みの磁性体粒子を含ませる方法(特許文献1参照)、(3) 別々に作製した高分子粒子と磁性体粒子とを複合化させる方法(特許文献2参照)が知られている。また、この他、(4) 磁性体粒子を高分子等で被覆する方法(特許文献3参照)がある。

【0003】

(1)の方法は鉄イオンを高分子粒子に吸収させるため、表面に磁性体が露出し、磁性体が酸化するという課題があった。(2)の方法は磁性体粒子が均一に粒子に取り込まれないという課題や粒径の制御が困難で、粒径分布の広い物となるという課題があった。(3)の方法は高分子粒子が凝集するため、粒径の小さな粒子には使用できないという課題があった。(4)の方法は、被覆が均一にできないため、浮遊性や分散性が悪く、また、磁性体粒子表面の一部が露出している場合があるという課題があった。

【0004】

一方、従来から知られている微量免疫測定法としては、ラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ等が既に実用化されている。これらの方法は、それぞれアイソトープ、酵素、蛍光物質を標識として付加した抗原又は抗体を用い、これと特異的に反応する抗体又は抗原の有無を検出する方法である。

このような免疫測定法に際して、磁性体内包粒子は効率よくかつ簡便にB/F分離を行うために用いられている。また、B/F分離以外の使用(特許文献4参照)や、磁性体内包粒子自体を標識材料とする免疫測定法(特許文献5、特許文献6、特許文献7参照)が開示されている。

【0005】

【特許文献1】特開平9-208788号公報

【特許文献2】特開平6-231957号公報

【特許文献3】特開平6-92640号公報

【特許文献4】特開2000-88852号公報

【特許文献5】特開平6-148189号公報

【特許文献6】特開平7-225233号公報

【特許文献7】特表2001-524675号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、上記現状に鑑み、均一な磁性を有するとともに、粒径分布が狭く、かつ分散安定性に優れており、免疫測定用として有用な磁性体内包粒子とその製造方法、及びそれを用いた免疫測定用粒子を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、有機高分子物質と平均粒径1~30nmの磁性体とからなる磁性体内包粒子であって、その内部に上記磁性体を分散状態で含有する磁性体内包粒子である。

以下に本発明を詳述する。

【0008】

本発明の磁性体内包粒子は、有機高分子物質と平均粒径 1 ~ 30 nm の磁性体とからなるものである。

上記有機高分子物質は、高分子粒子のコアを形成するための疎水性モノマー、及び／又は、水中で安定に分散する高分子粒子を形成しつつ高分子粒子のシェルを形成するための親水性モノマーからなる重合体を主構成成分とするものである。

特に、有機高分子物質中の疎水性モノマーの量が少なくなると粒子重合中に後述する金属イオンを取り込み難くなり、また、親水性モノマーの量が少なくなると得られる磁性体内包粒子の分散安定性が低下するので、これらを併用するのが好ましく、その割合は、疎水性モノマーが 5 ~ 97 重量%、親水性モノマーが 3 ~ 95 重量%であるのが好ましく、この範囲で必要に応じて適宜調整するのがより好ましい。

【0009】

<疎水性モノマー>

上記疎水性モノマーとしては、例えば、スチレン； α -メチルスチレン、p-メチルスチレン、p-クロロスチレン、クロロメチルスチレンなどのスチレン誘導体；塩化ビニル；酢酸ビニル、プロピオン酸ビニルなどのビニルエステル類；アクリロニトリルなどの不飽和ニトリル類；(メタ)アクリル酸メチル、(メタ)アクリル酸エチル、(メタ)アクリル酸ブチル、(メタ)アクリル酸2-エチルヘキシル、(メタ)アクリル酸ステアрил、エチレングリコール(メタ)アクリレート、トリフルオロエチル(メタ)アクリレート、ペンタフルオロプロピル(メタ)アクリレート、シクロヘキシル(メタ)アクリレート、グリシジルメタクリレート、テトラヒドロフルフリル(メタ)アクリレートなどの(メタ)アクリル酸エステル誘導体等が挙げられる。これら単量体は単独で用いてもよく、2種以上を併用しても良い。

【0010】

上記疎水性モノマーとしては、好ましくは、(メタ)アクリル酸メチル、(メタ)アクリル酸エチル、(メタ)アクリル酸ブチル、(メタ)アクリル酸2-エチルヘキシル、(メタ)アクリル酸ステアрил、エチレングリコール(メタ)アクリレート、トリフルオロエチル(メタ)アクリレート、ペンタフルオロプロピル(メタ)アクリレート、シクロヘキシル(メタ)アクリレート、グリシジルメタクリレート、テトラヒドロフルフリル(メタ)アクリレートなどの(メタ)アクリル酸エステル誘導体等のアクリル系モノマーが用いられる。

【0011】

上記疎水性モノマーとしては、より好ましくは、後述するように重合による粒子形成と磁性体形成とを同時進行するため、粒子重合中に高濃度に金属イオンを取り込む能力に優れたグリシジル基を有するアクリル系モノマーが用いられる。即ち、上記アクリル系モノマーの中でも、特にグリシジルメタクリレート(GMA)は鉄イオン及びマグネタイトとの親和性が高いため特に好適に使用される。

【0012】

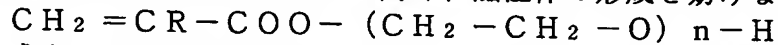
上記疎水性モノマーとしては、架橋性単量体も使用できる。上記架橋性単量体としては、例えば、ジビニルベンゼン、ジビニルビフェニル、ジビニルナフタレン、エチレングリコールジ(メタ)アクリレート、1,6-ヘキサンジオールジ(メタ)アクリレート、ネオペンチルグリコールジ(メタ)アクリレート、トリメチロールプロパントリ(メタ)アクリレート、テトラメチロールメタントリ(メタ)アクリレート、テトラメチロールプロパントテトラ(メタ)アクリレート、ジアリルフタレート及びその異性体、トリアリルイソシアヌレート及びその誘導体等が挙げられる。これら架橋性単量体は単独で用いてもよく、2種以上を併用しても良い。

この中でも、エチレングリコールジ(メタ)アクリレートは鉄イオン及びマグネタイトとの親和性が高いため好適に使用される。

【0013】

<親水性モノマー>

上記親水性モノマーとしては、例えば、アクリル酸、メタクリル酸、イタコン酸、フマル酸、マレイン酸などの重合性不飽和結合を有するカルボン酸；重合性不飽和結合を有するリン酸エステル；重合性不飽和結合を有するスルホン酸エステル；ジメチルアミノエチルメタクリレート4級塩、ジエチルアミノエチルメタクリレート4級塩などのアクリロイル基を有するアミンの塩；ビニルピリジン等のビニル基を有する含窒素化合物の塩などのカチオン基を有するビニル系単量体；2-ヒドロキシエチルメタクリレート、ポリエチレングリコール（メタ）アクリレート、（メタ）アクリルアミド、メチロールアクリルアミド、グリセロールメタクリレート（GLM）などの非イオン性ビニル系単量体等が挙げられる。これら親水性モノマーは、単独で用いてもよく、2種以上を併用しても良い。この中でも、下記一般式で表されるポリエチレングリコール（メタ）アクリレートは、水中で粒子を安定に分散する能力が高く、磁性体の形成を妨げないので好適に使用される。



式中、RはH又はCH₃を表し、nは2～20の整数を表す。nの好ましい下限は2であり、好ましい上限は10である。

【0014】

上記磁性体は、粒子を形成させる重合過程において粒子内部で金属イオンが酸化して形成したものであるのが好ましい。

＜金属イオン＞

上記金属イオンは、磁性体を形成するものであれば特に限定されないが、好ましくは、鉄イオン、コバルトイオン、ニッケルイオン等であり、より好ましくは、鉄イオンである。磁性体であるマグネタイトは塩化第2鉄を酸化剤等で酸化して得られる。

【0015】

上記磁性体の平均粒径は1～30nmである。1nm未満であると、磁性体の磁性応答特性が減少し、免疫測定に使用した際に測定感度が低下し、定性・定量分析が行い難くなる。また、30nmを超えると、磁性体内包粒子内での分散性が低下し、磁性が不均一になり、この場合も免疫測定に使用した際に定性・定量分析が行い難くなる。好ましい下限は2nmであり、好ましい上限は20nmである。さらに、好ましい上限は10nmであり、このような微小な磁性体粒子を形成するのは通常困難であるが、後述する製造方法のように、粒子を形成する工程と金属イオンを粒子中に取り込みながら金属イオンを酸化して磁性体を形成する工程とを同時進行させることにより、微小な磁性体を形成することが可能となる。

【0016】

本発明の磁性体内包粒子は、その内部に上記磁性体を分散状態で含有している。即ち、本発明の磁性体内包粒子においては、磁性体が粒子表面に露出することなく、粒子内部に分散した状態で存在している。

【0017】

本発明の磁性体内包粒子の磁性体含有量は、その重合組成により0.1～40重量%の範囲で調整するのが好ましい。0.1重量%未満であると、磁性体内包粒子の磁性応答特性が減少し、免疫測定に使用した際に測定感度が低下し、定性・定量分析が行い難くなる。また、40重量%を超えると、粒子の重合操作性が低下し、粒子重合中に金属イオンを取り込み難くなる。好ましい下限は1重量%であり、好ましい上限は30重量%である。

【0018】

本発明の磁性体内包粒子の平均粒径は、その重合条件により0.05～1μmの範囲で調整するのが好ましい。0.05μm未満や1μmを超えると、磁性体内包粒子の粒子形状の制御及び重合操作がしづらくなり、また、0.05μm未満では免疫測定法に適用した際に測定感度が低下し、定性・定量分析が行い難くなり、1μmを超えると免疫測定法に適用した際に、分散液において凝集により経時で粒子が沈降し易くなり、この場合も定性・定量分析が行い難くなる。好ましい下限は0.07μmであり、好ましい上限は0.8μmである。

【0019】

本発明の磁性体内包粒子は、水系溶媒中において疎水性モノマー及び／又は親水性モノマーを重合して粒子を形成する工程と、上記粒子中に金属イオンを取り込みながら上記金属イオンを酸化して磁性体を形成する工程とからなり、上記粒子を形成する工程と上記磁性体を形成する工程とを同時に進行させる方法により製造される。このような製造方法もまた、本発明の1つである。

【0020】

水系溶媒中において疎水性モノマー及び／又は親水性モノマーを重合して粒子を形成する工程においては、重合開始剤を添加するのが好ましい。

<重合開始剤>

上記重合開始剤としては特に限定されず、例えば、水溶性の有機アゾ化合物、無機過氧化物、有機過氧化物等が挙げられる。

上記重合開始剤の好適な例としては、過硫酸カリウム (KPS; 重合温度70℃)、アゾビスアミジノプロパン塩酸塩 (V-50; 重合温度70℃)、2, 2-アゾビス [2-(2-イミダゾリン-2-イル) プロパン] ジハイドロクロライド (VA-044; 重合温度60℃) 等が挙げられる。このうち、過氧化物系重合開始剤であるKPSは、重合開始とともに2価の鉄イオンの酸化に寄与することを期待して、モノマーと鉄イオンによる、重合とマグネタイト生成との同時進行を想定している。また、V-50及びVA-044は酸化力が弱く、2価の鉄イオンの緩やかな酸化反応に関与する重合開始剤となる。

上記重合開始剤は、 Fe^{2+} の酸化による消費や Fe^{3+} によってラジカル活性を失う場合があるため、重合による粒子成長を促す目的で、粒子成長過程に後添加することが有効である。この場合、新たな2次粒子は形成されず、粒子表面がポリマーで被覆される。

【0021】

<pH調整剤>

本発明において、重合と同時に磁性体を形成するにあたっては、重合系内のpHを塩基性に調整することが重要となる。例えば、重合開始剤としてKPSを用いた系では、メリットとして水中での分散安定性がよく、粒径分布の狭い単分散粒子が得られるが、デメリットとして酸化力の制御ができず、重合系内が酸性になるために、得られる磁性体内包粒子が磁石への引き寄せられ方の弱い粒子になることがある。一方、重合開始剤として酸化力を持たないVA-044を用いた系でのメリットは、重合系内のpHがほぼ中性であることである。

重合系内のpHを弱塩基性に保つには、pH調整剤として一般的な塩基を使用することができる。好適には NH_4OH がpH調整剤として使用される。

上記pH調整剤は、必要に応じて数回添加することができる。

【0022】

<重合方法>

本発明の磁性体内包粒子は、懸濁重合、分散重合、乳化重合、ソープフリー乳化重合等の粒子重合法が使用できるが、得られる磁性体内包粒子のCv値は5%以下であることが好ましいので、粒径分布の制御に優れたソープフリー乳化重合により好適に製造される。

以下、ソープフリー乳化重合による磁性体内包粒子の製造方法を例示するが、この方法に限定されるものではない。

【0023】

代表的な重合組成は、以下のとおりである。

親水性モノマー／疎水性モノマー／反応性乳化剤からなるモノマー組成物: 3 g
 H_2O : 100 g

四つ口フラスコに上記モノマー組成物及び水を秤量する。それぞれの口には攪拌棒、還流冷却管を取り付ける。次に、重合開始剤としてKPSとV-50を用いる系では70℃の、VA-044を用いる系では50℃～60℃の恒温槽に入れ、攪拌しながら系内を窒素置換する。その後、水に溶かした重合開始剤を注射筒で系内に注入する。この時点重合開始とし、所定時間後に注射筒を用いて磁性源となる $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ の水溶液を注入する。 $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ は重合開始剤の1/3～4倍モルを水5gに溶かしたも

のを使用する。即ち、重合開始剤により上述のモノマーの重合を開始するとともに2価の鉄イオンの酸化（マグネタイト化）を行うことにより磁性体内包粒子を製造する。

重合は開始から2時間～24時間行うことが好ましい。適度な酸化力を得るために、重合途中に NH_4OH を加えてもよく、更に、重合による粒子の成長を促すために、重合途中に重合開始剤を加えてもよい。この様にして磁性体を内包した高分子粒子である磁性体内包粒子を得ることができる。

【0024】

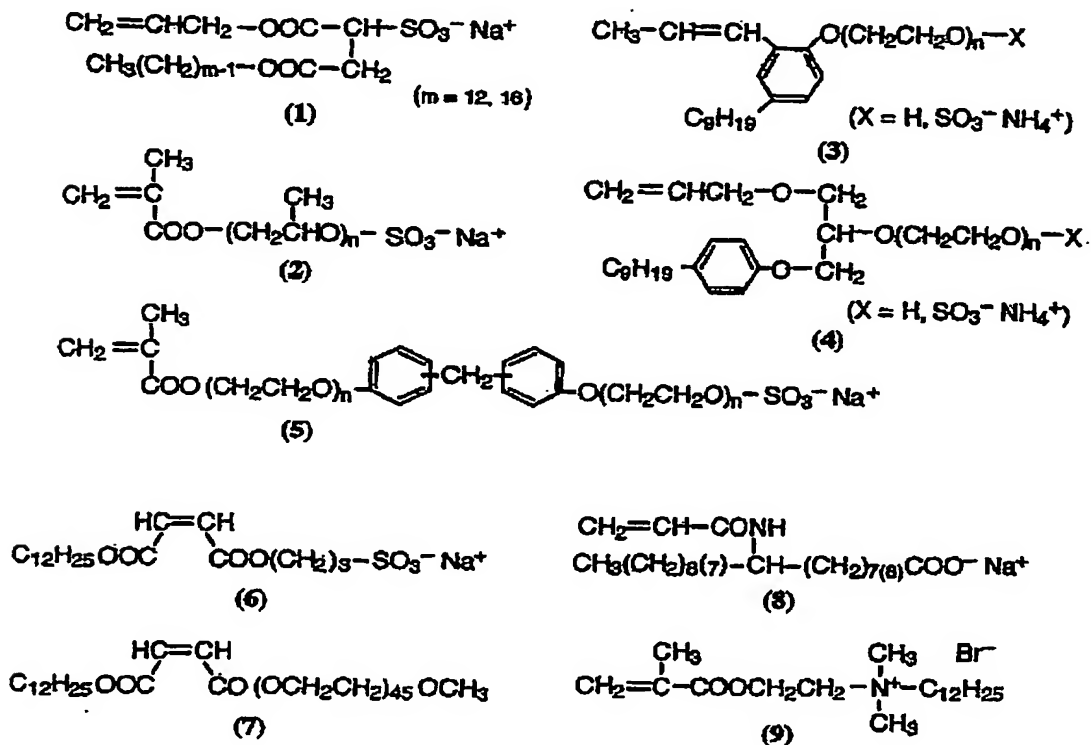
上記反応性乳化剤は共重合モノマーであり、必要に応じて添加してもよい。

<反応性乳化剤>

上記反応性乳化剤としては、例えば、下記一般式で表される反応性乳化剤類が挙げられ、これら反応性乳化剤は、単独で用いてもよく、2種以上を併用しても良い。

【0025】

【化1】



【0026】

得られた磁性体内包粒子は、残存モノマー、重合開始剤、未反応の鉄イオン等を取り除くために遠心分離・再分散を蒸留水で繰り返し行うことで精製する。遠心分離を行った後、上澄みをデカンテーションにより捨て、蒸留水を加え、ガラス棒により再分散を行う。精製後、ガラス製バイアルに移し、ふた・パラフィルムで密閉・保存する。

【0027】

本発明の磁性体内包粒子は免疫測定用に非常に適しており、磁性体内包粒子に抗原又は抗体を吸着又は結合させることにより免疫測定用粒子を得ることができる。このような免疫測定用粒子もまた、本発明の1つである。

本発明の磁性体内包粒子に抗体又は抗原を吸着又は結合させる方法としては特に限定されず、例えば、物理吸着法やカルボジイミドを用いた化学結合法等公知の方法を使用することができる。

【0028】

本発明の磁性体内包粒子又は本発明の免疫測定用粒子は、免疫測定法に好適に用いることができる。

上記免疫測定法としては、例えば、磁性体内包粒子を担体として用いたラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ等公知の方法が挙げられ、サンドイッチ法や競合法により、目的とする抗原又は抗体を測定することができる。また、上記方法の標識物質であるアイソトープ、酵素等の代わりに、磁性体内包粒子を標識として用いることができる。

【0029】

本発明の磁性体内包粒子は、磁性体を均一に分散含有する粒径分布の狭い粒子であるので、本発明の磁性体内包粒子を用いることにより磁性体を標識とする免疫測定法において感度よく精密に測定することができる。即ち、測定しようとする抗原又は抗体と特異的に反応する抗体又は抗原を磁性体内包粒子に結合させた免疫測定用粒子を用い、この免疫測定用粒子と測定しようとする抗原又は抗体とを反応させた後、反応した免疫測定用粒子における磁性体内包粒子の磁性量を測定することにより、測定しようとする抗原又は抗体を定性的かつ定量的に測定することができる。

【発明の効果】

【0030】

請求項1に記載の発明の磁性体内包粒子は、内部に平均粒径1～30nmの磁性体を含んでいるので、磁性体の磁性応答特性に優れているとともに、磁性体内包粒子内での磁性体の分散性にも優れており、即ち、磁性体内包粒子は、磁性が均一で、かつ、磁性応答特性に優れたものであり、さらに、粒径分布も狭く粒径が均一なものである。故に、測定感度等が要求される免疫測定用として好適に使用できるものであり、免疫測定法において免疫反応に寄与した磁性体内包粒子の磁性を測定することにより、優れた測定感度で、定性的のみならず定量的に免疫測定を行うことができる。また、表面が有機高分子物質から形成されているので、抗原又は抗体を確実に結合させることができる。

請求項2に記載の発明の磁性体内包粒子及び請求項3に記載の発明の磁性体内包粒子は、磁性体が粒子内部で金属イオン、好ましくは鉄イオンが酸化して形成されたものである。磁性体内包粒子内に確実にかつ均一に磁性体を取り込まれており、免疫測定法に要求される測定感度を確実に発現することができる。

請求項4に記載の発明の磁性体内包粒子は、磁性体内包粒子を構成する有機高分子物質がアクリル系モノマーであるので、重合による粒子形成が確実に行われるとともに、重合による粒子形成と磁性体形成とを確実に同時進行させることができる。故に、磁性体内包粒子は、磁性が均一であり、かつ、粒径分布も狭く、免疫測定法においてより優れた測定感度を発現することができる。

請求項5に記載の発明の磁性体内包粒子は、磁性体内包粒子を構成する有機高分子物質がグリシジル基を有するアクリル系モノマーであるので、磁性体を形成するのに好適な鉄イオン及びマグネタイトとの親和性に優れており、故に、磁性体内包粒子は磁性体がより均一に分散されたものとなり、免疫測定法に要求される測定感度がより優れたものとなる。

請求項6に記載の発明の磁性体内包粒子は、磁性体内包粒子を構成する有機高分子物質が特定の疎水性アクリル系モノマーと親水性アクリル系モノマーとの組合せであるので、粒子重合中に金属イオンを均一に取り込み易いだけでなく、磁性体内包粒子の分散安定性にも優れており、故に、分散液において凝集により経時で粒子が沈降することがなく、かつ、超音波処理等の余分な工程を必要とせず、免疫測定法などにおいて優れた測定感度を発現することができる。

請求項7に記載の発明の磁性体内包粒子は、平均粒径が0.05～1 μ mであるので、重合操作がし易く、即ち、上記のような磁性体内包粒子が確実に得られる。

請求項8に記載の発明の磁性体内包粒子は、磁性体の含有量が0.1～40重量%であるので、優れた磁性応答特性を均一かつ確実に発現することができ、免疫測定法により好適に適用することができる。また、重合操作もし易く、上記のような磁性体内包粒子が確実に得られる。

請求項9～13に記載の発明の製造方法は、粒子を形成する工程を磁性体を形成する工程とを同時進行させているので、上記の磁性体内包粒子を容易かつ確実に得ることができ

る。

請求項 14 に記載の発明の免疫測定用粒子は、担体である磁性体内包粒子が内部に平均粒径 1 ~ 30 nm の磁性体含有しているもので、磁性が均一で、かつ、磁性応答特性に優れたものであり、さらに、粒径分布も狭く粒径が均一なものである。また、表面が有機高分子物質で形成されているので、抗原又は抗体が確実に結合されている。故に、測定感度等が要求される免疫測定法に好適に使用できるものであり、免疫測定法において免疫反応に寄与した免疫測定用粒子における磁性体内包粒子の磁性を測定することにより、優れた測定感度で、定性的のみならず定量的に免疫測定を行うことができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0031】

以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

【0032】

(実施例 1 ~ 7)

200 ml の四つ口フラスコに表 1 に示す各種モノマー及び水 90 g を秤量した。それぞれの口には攪拌シールと攪拌棒、還流冷却管、セラムラバーを取り付けた。系を 70 °C の恒温槽に入れ、200 rpm で攪拌しながら系内を 30 分間窒素置換した。その後、水に溶かした重合開始剤である KPS 0.06 g を 10 g の水に溶解し注射筒で系内に注入した。この時点を重合開始とし、2 分後に注射筒を用いて所定量の $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 水溶液を注入した。重合は重合開始から 20 時間行った。適度な酸化力を得るために、重合途中に NH_4OH 0.165 g を加えた。

作製した粒子は、遠心分離・再分散を蒸留水で 4 回繰り返し行うことで精製した。この際、遠心分離は 20 °C、13500 rpm で行った。遠心分離を行った後、上澄みをデカンテーションにより捨て、蒸留水を加え、ガラス棒により再分散を行って磁性体内包粒子を得た。

【0033】

【表 1】

実施例	GMA	EGDM	AAm	PE-90	PE-350	NE-20	SE-20	$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
1	2.835	0.015	0.15	—	—	—	—	0.088
2	2.835	0.015	—	0.15	—	—	—	0.176
3	2.685	0.015	—	0.30	—	—	—	0.176
4	2.835	0.015	—	—	0.15	—	—	0.176
5	2.685	0.015	—	—	0.30	—	—	0.176
6	2.835	0.015	0.05	—	—	0.15	—	0.088
7	2.835	0.015	0.15	—	—	—	0.06	0.176

(単位: g)

【0034】

表中の記載は以下のとおりである。

GMA: グリシジルメタクリレート

EGDM: エチレングリコールジメタクリレート

AAm: アクリルアミド

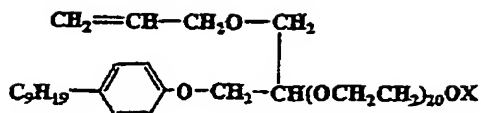
PE-90: ポリエチレングリコールメタクリレート (n=2)

PE-350: ポリエチレングリコールメタクリレート (n=8)

NE-20:

【0035】

【化2】



【0036】

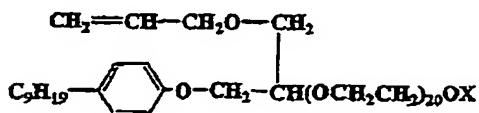
(式中、XはHを表す。)

【0037】

SE-20:

【0038】

【化3】



【0039】

(式中、XはSO₄NH₄を表す。)

【0040】

得られた磁性体内包粒子分散液について、目視で粒子の分散状態を観察した。また、精製した磁性体内包粒子を水で希釈し、金属メッシュで支持したコロジオン膜上に沈着固定して、透過型電子顕微鏡 (TEM) により、粒子の形態を観察した。

【0041】

実施例1は、一部凝集塊が認められ、時間が経つにつれて粒子が沈降する分散安定性のやや低いものであったため、超音波処理により再分散した。一方、親水性モノマーとしてポリエチレングリコールメタクリレートを用いた実施例2~5、及び、反応性乳化剤を用いた実施例6、7は、いずれも凝集塊が認められず、分散安定性の高い粒子が得られた。特に、反応性乳化剤を用いた実施例6、7は、粒子サイズが小さく、分散安定性が優れていることが認められた。また、実施例1~7の粒子は、いずれも粒子内部に磁性体を含み、粒子表面がきれいな輪郭であることが観察された。図1に実施例2の磁性体内包粒子のTEM写真 (平均粒径; 磁性体内包粒子0.21 μm、磁性体5 nm) を示した。

【0042】

作製した磁性体内包粒子 (実施例1~7) は、磁石へ引き寄せられることの確認として1.5 mlのマイクロチューブに少量取り、蒸留水で適当に希釈して磁石つきマイクロチューブ立て (DYNAL社製、MPC (登録商標) _M) にチューブを立てて、分散している粒子が磁石に引き寄せられることを目視により確認した。特に、親水性モノマーとしてポリエチレングリコールメタクリレートを用いた実施例2~5は、他の実施例に比べ磁力が大きいことがうかがえた。各実施例における磁性体内包粒子の磁性体の平均粒径を表2に示した。

【0043】

【表2】

実施例	平均粒径(nm)
1	5
2	5
3	6
4	6
5	8
6	3
7	5

【0044】

(実施例8)

200mlの四つ口フラスコに下記に示す各種モノマー及び水を秤量した。

AAm/GMA/EGDM/H₂O=0.15/2.835/0.015/90(g)

それぞれの口には攪拌シールと攪拌棒、還流冷却管、セラムラバーを取り付けた。系を70℃の恒温槽に入れ、200rpmで攪拌しながら系内を30分間窒素置換した。その後、水に溶かした重合開始剤であるKPS 0.06gを10gの水に溶解し注射筒で系内に注入した。この時を重合開始とし、所定時間後に注射筒を用いてFeCl₂・4H₂O水溶液(FeCl₂・4H₂O 0.165gを水5gに溶解)を注入した。重合開始1分後に適度な酸化力を得るためNH₄OH/H₂O=0.165/5(g)を加え、2時間重合を行った。

【0045】

作製した粒子は、遠心分離・再分散を蒸留水で4回繰り返し行うことで精製した。この際、遠心分離は20℃、13500rpmで行った。遠心分離を行った後、上澄みをデカンテーションにより捨て、蒸留水を加え、ガラス棒により再分散を行って磁性体内包粒子を得た。

【0046】

(実施例9)

重合開始後、所定時間に下記物質を添加したこと、重合時間が3時間であること以外は実施例8と同様に磁性体内包粒子を得た。

重合開始30分後 NH₄OH/H₂O=0.165/5(g)

重合開始60分後 KPS/H₂O=0.165/5(g)

【0047】

(実施例10)

重合開始後、所定時間に下記物質を添加したこと、重合時間が3時間であること以外は実施例8と同様に磁性体内包粒子を得た。

重合開始60分後 KPS/H₂O=0.165/5(g)、FeCl₂・4H₂O/H₂O=0.088/5(g)

重合開始120分後 GMA=0.5(g)、NH₄OH/H₂O=0.165/5(g)

【0048】

(実施例11)

重合開始後、所定時間に下記物質を添加したこと、重合時間が4時間であること以外は実施例8と同様に磁性体内包粒子を得た。

重合開始1分後 NH₄OH/H₂O=0.165/5(g)

重合開始120分後 KPS/H₂O=0.165/5(g)

【0049】

得られた磁性体内包粒子(実施例8~11)に対し、TEMによる粒子の形態観察を行った。

実施例9、10は、いずれも、実施例8よりも多くの磁性体を含み、粒径が増大してい

ることが認められた。また、実施例11では、内部に実施例9、10と同程度の磁性体を含み、粒子表面がきれいな輪郭であることが観察された。これまでの実験より、粒子成長の速い段階で NH_4OH を加えることは、成長を阻害する要因になっていることが推測された。一方、重合開始剤の後添加は、重合率がほぼ100%になり、また、2次粒子が形成されず粒子表面がポリマーで覆われていることが観察され、有効な手段であることが確認された。各実施例における磁性体内包粒子の磁性体の平均粒径を表3に示した。

【0050】

【表3】

実施例	平均粒径(nm)
8	8
9	8
10	10

【0051】

さらに、実施例2で得られた磁性体内包粒子から免疫測定用粒子を作製し、免疫測定を行った。

(免疫測定用粒子の作製)

実施例2で得られた磁性体内包粒子30mgにリン酸緩衝液(100mmol/l、pH7.5)6mlを加え、15000rpmにて20分間遠心分離を行った。得られた沈渣に、抗HBsAgモノクローナル抗体を0.25mg/mlの濃度になるようにリン酸緩衝液(100mmol/l、pH7.5)に溶解した溶液を1ml加え、室温にて20時間攪拌混和した。その後、未反応の抗HBsAgモノクローナル抗体を除去するために15000rpmにて20分間遠心分離を行い、さらに、得られた沈渣をリン酸緩衝液(100mmol/l、pH7.5)6mlに懸濁させ、再度15000rpmにて20分間遠心分離を行った。その後、得られた沈渣を、牛血清アルブミンを1重量%の濃度になるようにリン酸緩衝液(100mmol/l、pH7.5)に溶解した溶液6mlに懸濁させ、室温で1時間攪拌してブロッキング処理を行い、抗HBsAgモノクローナル抗体が磁性体内包粒子に結合された免疫測定用粒子を得た。

次に、得られた免疫測定用粒子を冷蔵保存するため、15000rpmにて20分間遠心分離を行い、得られた沈渣を、牛血清アルブミンの濃度が1重量%になるようにリン酸緩衝液(100mmol/l、pH7.5)に溶解し、さらに、アジ化ナトリウムを0.01重量%の濃度になるように溶解した溶液6mlに懸濁させ、すぐに冷蔵保存した。

【0052】

(試験片の作製)

ニトロセルロースメンブレン(SRHF、日本ミリポア社製)を幅30cm×長さ6cmに裁断し、その長さ方向上端より3cmの部位(反応部位)に、上記免疫測定用粒子で用いたものとは異なる反応エピトープを有する抗HBsAgモノクローナル抗体を2.0mg/mlの濃度になるようにトリス塩酸緩衝液(10mmol/l、pH7.4)に溶解した溶液を幅0.7mmの直線状に塗布した。その後、37℃で2時間乾燥した後、牛血清アルブミン(和光純薬社製)を1重量%の濃度になるようにリン酸緩衝液(100mmol/l、pH7.5)に溶解した溶液に1時間浸漬し、ブロッキング処理を行った。さらにその後、ラウリルベンゼンスルホン酸ナトリウムを0.1重量%の濃度になるようにリン酸緩衝液(100mmol/l、pH7.5)に溶解した溶液にて洗浄後、シリカゲルデシケーター内で室温下にて乾燥し、抗HBsAgモノクローナル抗体固定化膜を得た。

得られた抗HBsAgモノクローナル抗体固定化膜を幅5mmに裁断し、長さ方向上端に幅5mm×長さ2cmの吸水用ろ紙(日本ミリポア社製)を重ね、透明なテープで固定して試験片とした。

【0053】

(免疫測定の実施)

リン酸緩衝液 (100 mmol/l 、 $\text{pH} 7.5$) に上記免疫測定用粒子を 0.1 重量%の濃度になるように溶解し、さらに牛血清アルブミンを 1 重量%の濃度になるように溶解し、さらにアジ化ナトリウムを 0.01 重量%の濃度になるように溶解した溶液を作製し、該溶液 $20\text{ }\mu\text{l}$ を 96 ウェルマイクロプレート (ナルジェヌンクインターナショナル社製) の各ウェルに添加した。

次に、HBs 抗原標準品 (50 IU/ml) を所定の濃度になるようにリン酸緩衝液 (100 mmol/l 、 $\text{pH} 7.5$) で希釈し、各々 $100\text{ }\mu\text{l}$ をウェルに添加混合後、試験片をウェル内に入れ、立位するように立てた。

30 分後、試験片を取り出した所、反応部位において HBs 抗原濃度に応じた磁性が確認され、磁性を標識とする免疫測定法に有用であることが示された。

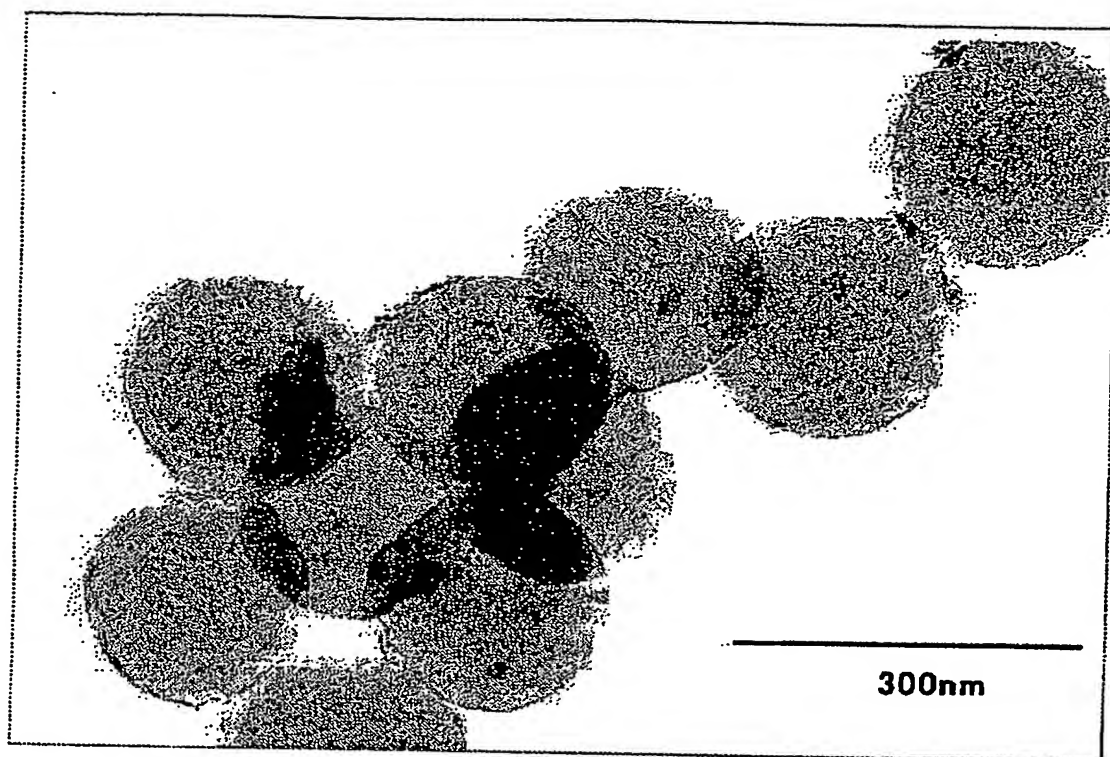
【図面の簡単な説明】

【0054】

【図1】実施例2の磁性体内包粒子 (平均粒径; 磁性体内包粒子 $0.21\text{ }\mu\text{m}$ 、磁性体 5 nm) の TEM 写真である。

【書類名】図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 均一な磁性を有するとともに、粒径分布が狭く、かつ分散安定性に優れており、免疫測定用として有用な磁性体内包粒子とその製造方法、及びそれを用いた免疫測定用粒子を提供する。

【解決手段】 有機高分子物質と平均粒径 1 ～ 3 0 n m の磁性体とからなる磁性体内包粒子であって、その内部に前記磁性体を分散状態で含有することを特徴とする磁性体内包粒子。

【選択図】 なし

特願 2003-360986

出願人履歴情報

識別番号

[000002174]

1. 変更年月日

1990年 8月29日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号

氏 名

積水化学工業株式会社